



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS (IREC)

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN RECURSOS CINEGÉTICOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**ESTUDIO GENÉTICO Y SANITARIO DE UNA
POBLACIÓN DE PERDIZ ROJA (*Alectoris rufa*) NO
AFECTADA POR SUELTAS DE PERDIZ DE GRANJA**

Autor:
Igor Castro Otero

Tutores:
Úrsula Höfle Hansen
José Antonio Dávila García
Christian Gortázar Schmidt

Tema: Investigación en Sanidad Animal

Ciudad Real, Octubre 2015

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. INTROGRESIÓN GENÉTICA	2
1.2. ENFERMEDADES	4
1.2.1. Virus.....	3
I. Influenza aviar	4
II. Flavivirus: 1-Bagaza Virus.....	5
III. Flavivirus: 2-West Nile Virus	6
IV. Flavivirus: 3-Usutu virus	7
V. Coronavirus	8
VI. Newcastle disease	9
VII. Herpesvirus	10
VIII. Polyomavirus.....	12
IX. Reovirus	13
1.2.2. Enterobacterias	14
1.2.3. Parásitos	16
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	18
2.2. AVES ESTUDIADAS.....	18
2.3. ESTUDIO DE INTROGRESIÓN GENÉTICA Y SEXADO MOLECULAR	19
2.4. ANÁLISIS SANITARIOS.....	19
2.4.1. Virus.....	19
I. Influenza aviar	20
II. Flavivirus.....	20
III. Coronavirus	20
IV. Newcastle disease	21
V. Herpesvirus.....	21
VI. Polyomavirus	21
IX. Reovirus	22
2.4.2. Bacterias	22
2.5. ANÁLISIS PARASITARIOS	22
3. RESULTADOS	24
3.1. AVES ESTUDIADAS.....	24

3.2. INTROGRESIÓN GENÉTICA	25
3.3. PATÓGENOS	25
3.3.1. Virus.....	25
3.3.2. Bacterias	25
3.3.3. Parásitos	25
4. DISCUSIÓN.....	26
4.1. INTROGRESIÓN GENÉTICA	26
4.2. PATÓGENOS	26
4.2.1. Virus.....	26
I. Influenza aviar	26
II. Flavivirus: 1-Bagaza Virus.....	27
III. Flavivirus: 2-West Nile Virus	27
IV. Flavivirus: 3-Usutu virus	27
V. Coronavirus	28
VI. Newcastle disease	28
VII. Herpesvirus	28
VIII. Polyomavirus.....	29
IX. Reovirus	29
4.2.2. Bacterias	29
4.2.3. Parásitos	30
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

La introducción de aves criadas en granja en el medio natural con el objetivo de reforzar las poblaciones naturales de perdiz roja (*Alectoris rufa*), es considerada como un método de gestión conflictivo debido a su riesgo potencial de introducir parásitos y enfermedades en los hábitats donde estas sueltas se producen. Así mismo los ejemplares introducidos presentan una dudosa genética, presentando en la mayoría de los casos introgresión de perdiz chucar (*Alectoris chukar*).

Hemos estudiado el estado sanitario y la pureza genética de nueve perdices procedentes del noroeste de la provincia de León, pertenecientes a un coto de caza en el cual no se realizan sueltas ni manejo de las poblaciones de perdiz. Se realizaron análisis genéticos para detectar introgresión y análisis sanitarios (microbiología, coprología, detección molecular de genoma vírico) para determinar su estado sanitario.

Los datos obtenidos arrojan unos resultados alentadores, puesto que nos hemos encontrado con un grupo de aves en las que no se ha detectado introgresión genética de chucar, y que presentan un buen estado sanitario al no haberse detectado la presencia de virus (IA, flavivirus, coronavirus, Newcastle, herpesvirus, polyomavirus, reovirus) ni enterobacterias.

Palabras clave: Perdiz roja; Intogresión genética; Influenza aviar; Flavivirus; Coronavirus; Newcastle; Herpesvirus; Polyomavirus; Reovirus; Enterobacterias; Parásitos.

1. INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es una especie mediterránea, endémica del suroeste de Europa, donde su distribución natural engloba Francia, el noroeste de Italia y la Península Ibérica, incluyendo las islas mediterráneas de: Córcega, Elba y las Islas Baleares (Ferrero *et al.*, 2011). Se reconocen tres subespecies de *A. rufa*, dos de las cuales están restringidas a España y Portugal. *Alectoris rufa rufa* se distribuye a lo largo de Francia, el noroeste de Italia, Elba y Córcega; *Alectoris rufa hispanica* en el norte y noroeste de la Península Ibérica y *Alectoris rufa intercedens*, en el este y sur (Snow & Perrins, 1998). Se estima que la población mundial puede situarse entre los 2,2-4,5 millones de parejas, con aproximadamente el 77% en la península Ibérica (2,5 millones) (Aebischer & Lucio, 1997; BirdLife International/EBCC, 2000).

La perdiz roja puede vivir desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altitud. Es una especie sedentaria, aunque en áreas de montaña puede realizar desplazamientos altitudinales (Blanco-Aguilar *et al.*, 2004)

Prefiere los climas secos y templados y su distribución está asociada con las áreas de cultivo, aunque debido a su plasticidad ecológica puede ocupar una gran variedad de tipos de hábitat.

La alimentación de los adultos es principalmente vegetariana aunque también consumen en menor grado artrópodos (Jiménez *et al.*, 1991); los pollos (durante las tres primeras semanas) se alimentan principalmente de insectos (Rueda *et al.*, 1993), por lo que alteraciones en la diversidad de insectos pueden provocar reducciones en la productividad de esta especie.

1.1. INTROGRESIÓN GENÉTICA

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es una de las especies de caza menor más abundantes de la península ibérica, alcanzando las mayores densidades en el centro y sur de la península, presentando menores densidades a lo largo de la costa Mediterránea (Blanco-Aguilar *et al.*, 2003).

La práctica de su caza es una de las más importantes actividades sociales y económicas en el centro-sur peninsular (Bernabeu, 2000). Durante las últimas décadas se ha producido un descenso en las poblaciones silvestres de perdiz roja como consecuencia de los cambios acaecidos en la agricultura. Este descenso unido a la necesidad de elevadas densidades de aves para la caza, ha hecho necesario que se tengan que reforzar las poblaciones naturales con aves procedentes de granjas para así poder mantener el

1. Introducción

número de capturas. Se estima que en la Península Ibérica se han cazado durante las últimas dos décadas entre dos y cuatro millones de perdices anualmente (MAAMA, 2013; Delibes, 1992) y han sido liberadas en el medio natural aproximadamente diez millones de perdices procedentes de granjas cada temporada de caza para reforzar las poblaciones naturales (Caro *et al.*, 2014). La introducción de estos animales procedentes de cría en cautividad, ha venido acompañada de la introducción en el medio natural de parásitos y enfermedades no presentes en este (Millán *et al.*, 2004; Villanuá *et al.*, 2008; Diaz-Sanchez *et al.*, 2012), así como de ejemplares de dudosa pureza genética, que frecuentemente incluyen híbridos con *A. chucar* (Blanco-Aguilar *et al.*, 2008; Martínez Fresno *et al.*, 2008; Barbanera *et al.*, 2010). Estos híbridos con *A. chucar* se deben a que en cautividad *A. chucar* es la más prolífica dentro de género *Alectoris*, por lo que hibridándola con *A. rufa* se logra aumentar la productividad de esta última (Barbanera *et al.*, 2010).



Imagen 1: de izquierda a derecha: *A. chucar*, híbrido de 1ª generación, híbrido de 2ª generación, *A. rufa*.

1.2. ENFERMEDADES

La suelta de perdices en el medio natural para reforzar las poblaciones de perdiz roja con fines cinegéticos, ha originado en muchas ocasiones la transmisión de parásitos y enfermedades típicas de animales criados en granjas a las poblaciones silvestres (Díaz-Sánchez, *et al.*, 2011), con sus consecuentes efectos negativos sobre dichas poblaciones. Otro punto a tener en cuenta es la aparición de nuevas enfermedades infecciosas en la fauna (Alexander 2003; Capua & Alexander, 2002), así como la transmisión de

1. Introducción

patógenos de humanos y animales domésticos a animales silvestres, lo cual ha incrementado el interés general de las aves como hospedadores de patógenos.

1.2.1. Virus

I. Influenza aviar

a) Etiología

La gripe aviar o IA es el resultado de la infección por virus de *influenza A*, genero *influenzavirus A*, familia *Orthomyxoviridae*. Existen tres tipos de influenza A, B, y C, pero solo los del tipo A infectan a las aves (OIE, 2015).

La gripe o IA causada por los subtipos H5 y H7 de virus de influenza aviar es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa de declaración obligatoria, incluida en la lista del Código Zoosanitario Internacional de la OIE. Los virus de IA se clasifican como virus IA de baja patogenicidad (LPAI), y virus IA de alta patogenicidad (HPAI). HPAI es endémica en determinados países, apareciendo de manera regular en otros (Alexander, 1987). Desde el primer brote de HPAI causado por virus del subtipo H5 en 1959 (Pereira *et al.*, 1965), han sido registrados brotes de HPAI en multitud de ocasiones.

El primer caso de aislamiento del virus de influenza A de alta patogenicidad en aves silvestres fue en 1961, en charranes comunes (*Sterna hirundo*) en el Sur de África (Becker, 1966).

b) Epidemiología

Solo los virus de influenza del tipo A causan infecciones naturales en aves, sin embargo todos los virus del H1-H15 haemagglutinin (HA) y todos los N1-N9 neuraminidase (NA) y subtipos de influenza A y todas sus posibles combinaciones han sido aislados en aves (Alexander, 2000).

Los virus de influenza A que infectan aves de corral pueden dividirse en dos grupos en función de su capacidad de causar dolencias en las aves afectadas. Las cepas más virulentas (HPAI) causan gripe aviar o "*Fowl plague*", presentando las aves afectadas alguno de los siguientes signos clínicos: postración y depresión extrema, edema y congestión de carúnculos y crestas, tos, estornudos y signos nerviosos, diarrea, edema de la piel debajo de los ojos, pudiendo llegar a causar una mortalidad del 100%. Estos virus han sido restringidos a los subtipos H5 y H7. Sin embargo la mayoría de los virus de influenza aviar (VIA) son de baja patogenicidad (LPAI) causando ninguna dolencia o

1. Introducción

lesión o una afección respiratoria denominada LPAI, cuyos signos clínicos son plumaje erizado o efectos leves en el sistema respiratorio que puede verse agravado con otras infecciones o con las condiciones ambientales, resultando en una afección más grave (Alexander, 2000).

Las aves silvestres pueden portar LPAIV en el tracto respiratorio o intestinal, pero no suelen padecer signos clínicos, siendo las aves acuáticas un importante reservorio de estos virus (Yoon *et al.*, 2014). En general, no hay certeza respecto a las especies silvestres involucradas, las rutas migratorias utilizadas y sobre todo, la posibilidad de que algunas especies puedan ser reservorios permanentes del virus H5N1, sin que los individuos portadores manifiesten signos clínicos.

La principal vía de transmisión es la fecal-oral, pudiendo los virus de la influenza aviar propagarse por contacto directo con las secreciones de aves infectadas, en especial las heces, o con piensos, agua, equipos y ropa contaminados (OIE, 2015).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Pese al limitado número de brotes de HPAI declarados en España, la situación geográfica como ruta migratoria de gran cantidad de especies entre Europa y África, el elevado número de humedales, así como la diversidad de especies de aves presentes, hacen que en nuestro país exista un riesgo elevado de entrada y mantenimiento de virus de HPAI.

En recientes estudios experimentales en los que se inoculó HPAIV (H7N1) y LPAIV (H7N9) en perdices, se observaron signos clínicos y una mortalidad del 100% en las aves infectadas por H7N1 mientras que las infectadas por H7N9 no mostraban signos clínicos ni mortandad. De este estudio podemos deducir que la perdiz roja es muy susceptible a H7N1 HPAI y que es probable que no sea un reservorio para especies de LPAI (Bertran *et al.*, 2011).

II. Flavivirus: 1-Bagaza Virus

a) Etiología

El Bagaza virus (BAGV) es un miembro del género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* y perteneciente al complejo antigénico Ntaya virus. Este complejo incluye otras cuatro especies, el virus de la meningoencefalitis de los pavos de Israel (ITMV), que en estudios recientes ha demostrado ser la misma especie que BAGV (Fernández-

1. Introducción

Pinero *et al.*, 2014), el virus Ilheus, el virus Ntya y el virus Tembusu (King *et al.*, 2011).

b) Epidemiología

La estrecha relación genética entre BAGV e ITMV, importante patógeno de aves en Israel y Sudáfrica, sugiere que el BAGV podría causar mortalidad en varias especies de aves (Kuno & Chang, 2007). Sin embargo, la información relativa a la patogenicidad de BAGV es muy limitada, se desconocen hasta la fecha las especies de aves implicadas en el mantenimiento del virus en el medio natural.

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

En el verano de 2010 un elevado número de perdices fueron encontradas muertas en diversas áreas de caza del sur de España. Los signos clínicos de los animales afectados incluían debilidad, postración, pérdida de peso, pérdida de coordinación motora, diarrea (Agüero *et al.*, 2011; Gamino *et al.*, 2102).

III. Flavivirus: 2-West Nile Virus

a) Etiología

West Nile Virus (WNV) es un virus transmitido por mosquitos que afecta al sistema nervioso, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* (Escribano *et al.*, 2013). En su ciclo natural, los mosquitos actúan como vectores del virus y una amplia variedad de especies aviares como reservorios primarios de la infección vírica (Sotelo *et al.*, 2011).

b) Epidemiología

Las aves actúan como reservorios naturales del WNV, tras la picadura de un mosquito no infectado sobre un ave infectada, se produce la multiplicación del virus en el vector, el cual puede infectar a otras aves, caballos y humanos (Rappole & Hubalek, 2003) causando una grave encefalitis (Reed *et al.*, 2003).

WNV lleva circulando por Europa durante décadas pero recientemente el número, la frecuencia y severidad de los brotes que originan daños neurológicos se han incrementado de forma considerable, propagándose por Europa, siendo un serio problema veterinario y de salud pública (Martín & Saiz, 2012). Las aves migratorias

1. Introducción

juegan un papel importante en la dispersión local y a larga distancia del virus (Malkinson & Banet, 2002; Peterson *et al.*, 2003).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Hoy en día, solo ha sido descrito un brote de WNV en los Estados Unidos en perdices chucar (*Alectoris chukar*) en cautividad, originando una mortalidad en el 25% de los ejemplares (Wünschamann & Ziegler, 2006). Recientes estudios han demostrado mediante infección experimental que la perdiz roja (*Alectoris rufa*) es susceptible a padecer WNV (Sotelo *et al.*, 2011; Escribano-Romero *et al.*; 2013)

IV. Flavivirus: 3- Usutu virus

a) Etiología

Usutu virus (USUV) es un virus perteneciente al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, siendo un flavivirus transmitido por mosquitos perteneciente al serocomplejo JEV (Virus de la encefalitis japonesa) (Kuno *et al.*, 1998; Calisher & Gould, 2003).

Originalmente aislado en mosquitos de la especie *Culex neavei* en Sudáfrica en 1959 (Williams *et al.*, 1964; McIntosh, 1985), USUV ha sido detectado en diferentes especies de mosquitos y aves a lo largo de varios países africanos: Senegal, Nigeria, Uganda, Burkina Faso, República Central Africana, Marruecos (Nikolay *et al.*, 2011). En el año 1996 el virus llegó a Europa produciendo una elevada mortalidad en mirlo común (*Turdus merula*) en Italia, considerándose que a partir de este momento se estableció una circulación local entre mosquitos y aves del centro de Europa, dando lugar a brotes posteriores como el registrado en Austria en 2007, (Weissenböck *et al.*, 2002).

b) Epidemiología

El ciclo de USUV es similar a la de otros miembros del serocomplejo JEV. En su ciclo natural intervienen varias especies de mosquitos, los cuales actúan como vectores y aves que actúan como hospedadores (Vázquez *et al.*, 2011). Los signos clínicos asociados a infecciones naturales por USUV han sido descritos principalmente en mirlo común (*Turdus merula*) y algunas especies de rapaces nocturnas. Los signos clínicos que se pueden observar son depresión, apatía, anorexia, incapacidad para volar, erizamiento de las plumas convulsiones e incoordinación y muerte rápida que suele ocurrir a los tres

1. Introducción

días tras la aparición de los primeros síntomas (Manarolla *et al.*, 2010; Steinmetz *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2012).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

La especie que muestra una mayor sensibilidad frente a la infecciones causadas por USUV es el mirlo común (*Turdus merula*), en la cual origina una elevada tasa de mortandad (Calorazi *et al.*, 2012 y 2013; Bakonyi *et al.*, 2007).

El virus también ha sido aislado en ejemplares de perdiz roja (*Alectoris rufa*) en Italia en 2010-2011 (Calorazi *et al.*, 2012 y 2013).

V. Coronavirus

a) Etiología

Los coronavirus son un grupo de virus perteneciente al género *Coronavirus*, orden *Nidovirales*, el cual incluye las familias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* y *Roniviridae*.

Los coronavirus causan gran variedad de enfermedades en animales, y su capacidad para producir enfermedades en animales de granja y de compañía ha hecho que hayan sido estudiados en la última mitad del siglo veinte (Fehr & Perlman, 1976). El primer coronavirus aislado fue el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), siendo descrito por primera vez en los EE.UU. en los años treinta. IBV es un coronavirus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*. Existen fundamentalmente tres serotipos del virus de la IBV en Norte América, los denominados Massachussets, Connecticut y Arkansas 99. En Europa, las denominadas variantes holandesas, designadas mediante números D-274 y D-212 (Acevedo, 2010).

b) Epidemiología

La bronquitis infecciosa aviar (IBV) es una enfermedad de amplia distribución mundial (Cavanagh D., 2005; Gelb *et al.*, 1997). El virus es altamente infeccioso, transmitiéndose por vía aerógena, directamente por el contacto entre aves e indirectamente a través de medios mecánicos en granjas de cría de aves (equipamiento contaminado, vehículos o materiales del embalaje de los huevos, entre otros elementos) pudiendo co-circular varios serotipos en una región (Capua *et al.*, 1999).

El período de incubación de la enfermedad es de entre 18-36 horas post-infección dependiendo de la dosis y ruta de inoculación. Los pollos de todas las edades son

1. Introducción

susceptibles pero la enfermedad es más severa en pollos de corta edad causando una elevada mortalidad (Cavanagh *et al.*, 1997). Con el incremento de la edad de los pollos, estos se hacen más resistentes a los efectos nefropatogénicos, a las lesiones en el oviducto y la mortalidad debido a la infección (Albassam *et al.*, 1986).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Los coronavirus genéticamente similares a IBV están siendo cada vez más detectados en especies aviares (Liu *et al.*, 2005, Sun *et al.*, 2007). Existe evidencia de que IBV tiene un rango de hospedadores amplio y no solo comprende aves galliformes, sino también aves no galliformes (Hughes *et al.*, 2009).

En China, se han aislado coronavirus en pavo (*Pavo sp.*), gallinas de Guinea (*Numida meleagris*), perdices (*Alectoris sp.*) y también en aves no gallináceas como por ejemplo cercetas (*Ana streperas*), en zonas próximas a los lugares en los que se criaban aves domésticas (Cavanagh, 2005).

En el Reino Unido ha sido registrado un caso de aislamiento del coronavirus (phUK438/94) en una granja de faisanes (*Phasianus colchicus*), causando mortalidad súbita de un 15% de las aves que presentaban como único síntoma clínico de la enfermedad estornudos (Gough *et al.*, 1996.). Estudios confirman la presencia de coronavirus en faisanes y que se encuentran asociados frecuentemente con enfermedades respiratorias (Cavanagh *et al.*, 2002).

VI. Newcastle disease

a) Etiología

La enfermedad de Newcastle (ND) fue descubierta en Indonesia en 1926, pero fue denominada por el pueblo de Newcastle-on-Tyne, Inglaterra, donde ocurrió en 1927. La enfermedad de Newcastle (ND) está causada por cepas del paramixovirus aviar tipo 1 (aPMV-1), perteneciente al género *Avulavirus*, subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*. Las cepas de aPMV-1 se clasifican en tres patotipos según su virulencia en pollos: lentogénica o leve que presenta una infección respiratoria leve o subclínica; mesogénica o moderada que cursa con signos respiratorios y nerviosos ocasionales y velogénica o muy virulenta que se divide a su vez en neurotrópico que presenta signos respiratorios y nerviosos y alta mortalidad y viscerotrópico que presenta lesiones intestinales hemorrágicas (Alexander & Senne, 2008).

1. Introducción

b) Epidemiología

Esta enfermedad se ha detectado en todo el mundo y afecta tanto a aves silvestres como domésticas, por lo que puede producirse un brote en cualquier lugar donde se críen aves (OIE, 2012).

Es una enfermedad vírica muy contagiosa de curso febril agudo o sobreagudo, cuyos signos clínicos contemplan cuadros respiratorios, nerviosos, entéricos y hemorragias en diversos órganos, aunque estos signos clínicos varían mucho en las aves afectadas pues dependen de factores como: el virus, la especie hospedadora, la edad del hospedador, las condiciones ambientales, etc.

La enfermedad se transmite por inhalación o ingestión (ruta fecal/oral). Las aves expulsan el virus por las heces y secreciones respiratorias. Las gallináceas excretan aPMV-1 durante 1 o 2 semanas.

La epidemiología de aPMV-1 no está determinada de forma completa, aunque se cree que las aves silvestres, en especial los columbiformes pueden actuar como reservorios para los virus lentogénicos.

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Diversos estudios reflejan que la perdiz roja (*Alectoris rufa*) presenta una elevada resistencia frente a la enfermedad (Geral *et al.*, 1976), sin embargo la regular presencia de columbiformes migratorias portadoras de aPMV-1 durante el invierno en los cotos de caza y alrededor de granjas cinegéticas hace sospechar una elevada exposición al virus al menos en zonas de manejo intensivo de la especie (sueltas y agregación en comederos).

VII. Herpesvirus

a) Etiología

Los herpesvirus se encuentran entre los más grandes y complejos virus (Seimon *et al.*, 2012). Los herpesvirus pertenecen a la familia *Herpesviridae* que se divide a su vez en tres subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammapherpesvirinae* (Davison, 2002; McGeoch *et al.*, 2006). Todos los herpesvirus aviares pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y se agrupan en *Iltovirus* o *Mardivirus* (Thureen & Keeler, 2006). *Mardivirus* (Marek's disease virus 1 y 2) e *iltovirus* (Gallid herpesvirus 1) han sido caracterizados en multitud de especies de gallináceas (Alfonso *et al.*, 2001; Hughes & Rivallier, 2007; Osterrieder *et al.*, 2006; Thureen & Keeler, 2006). Marek's

1. Introducción

disease virus (MDV) es un Alphaherpesvirus oncogénico que causa tumores en aves susceptibles (Zhang *et al.*, 2015). MDV es un miembro del género *Mardivirus* que presenta dos serotipos, 1 y 2 (MDV-1 y MDV-2) así como el serotipo 3 o herpesvirus de los pavos (HVT) (Davison, 2002). El serotipo 1 incluye todos las cepas patogénicos y oncogénicas de MDV así como las cepas atenuadas, el serotipo 2 incluye las cepas no patogénicas y oncogénicas de MDV y el serotipo 3 HVT es no oncogénico y ha sido aislado en pavos (Nair, 2005). Las cepas de MDV se clasifican en cuatro patotipos: leve (m), virulento (v), muy virulento (mv) y muy vitulento + (mv+) (Witter, 1997, Witter *et al.*, 2005).

La laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) está causada por "Gallid herpesvirus typ 1", siendo descrita por primer vez en 1925 (May & Tittsler, 1925).

b) Epidemiología

MDV es una importante enfermedad que afecta a pollos, reconocida hace un siglo por el veterinario húngaro Jozsef Marek (Marek, 1907). La enfermedad clásica se manifiesta como polineuritis y parálisis como resultado de la infiltración linfoide en los nervios periféricos (Nair, 2005).

MD es ante todo una enfermedad linfoproliferativa de pollos de corral y menos común en pavos, faisanes y codornices. La patogenia de MD es compleja y no comprendida completamente. La infección ocurre por inhalación de polvo contaminado con partículas epiteliales del folículo de la pluma procedentes de aves infectadas en las granjas de cría de pollos (Nair, 2005).

La laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) es una afección que tiene como órgano diana el tracto respiratorio. El epitelio de la tráquea y la laringe están siempre afectados mientras que otras membranas mucosas, senos respiratorios, sacos aéreos y pulmones pueden llegar a verse afectados (Bagust & Johnson, 1995).

La replicación del virus ocurre solo durante la primera semana tras la infección, aunque bajos niveles de ILPV pueden ser detectados de forma esporádica 10 días después tras la infección (Bagust *et al.*, 1986). Los signos clínicos de la enfermedad respiratoria aparecen entres los 6-12 tras la exposición (Bagust & Johnson, 1995).

1. Introducción

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Codornices, pavos, faisanes y algunas especies de patos y gansos son susceptibles de padecer MDV. Otras especies como gorriones, perdices, palomas y los pavos reales son probablemente refractarios. Brotes naturales ocurren en bandadas comerciales de codornices japonesas. Las aves afectadas desarrollan linfomas en varios órganos, pero los nervios periféricos raramente son afectados. En pavos durante los brotes ocurridos entre 1997 y 2002 se produjeron mortalidades de entre el 40-80% de las aves afectadas, presentando los individuos afectados parálisis e infiltración con linfocitos de los nervios periféricos. También ha sido aislado MDV en gansos, patos y faisanes (Swayne, 2013).

VIII. Polyomavirus

a) Etiología

El polyomavirus aviar (APV) es un miembro de la familia *Papovaviridae*, que está a su vez dividida en dos géneros, papilomavirus y polyomavirus. APV se clasifica dentro de los polyomavirus y es el único polyomavirus que puede causar la muerte en multitud de especies de psitácidos (Commonwealth of Australia, 2006).

b) Epidemiología

APV fue considerado como un patógeno de los periquitos (*Melopsittacus undulatus*), siendo a principios de la década de los ochenta (Davis *et al.*, 1981) reconocido como el agente que causaba la conocida como "*Muda francesa*" (*Budgerigar fledgling disease*, BFD). Este virus no solo causa una enfermedad severa que afecta a los periquitos, sino que afecta a una amplia variedad de Psitaciformes, Paseriformes, Falconiformes, Gallináceas (Mamom *et al.*, 2009, Rahaus *et al.*, 1991; Rossi *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 1993), siendo la enfermedad muy agresiva, resultando fatal en aves jóvenes (Bernier *et al.*, 1981; Pass *et al.*, 1987; Rahaus & Wolff, 2005).

La transmisión del virus de unas aves a otras se produce por exposición con las aves infectadas, presencia de aves infectadas con PCD, si bien la transmisión horizontal es la principal vía de transmisión del virus, es probable que también se produzca esta transmisión de forma vertical (Commonwealth of Australia, 2006). La estabilidad del virus en el ambiente crea un grave problema debido a que las aves infectadas pueden excretar el virus en las heces (Szweda *et al.*, 2001). Los síntomas clínicos que muestran las aves que presentan infecciones agudas son: poliuria, hemorragias subcutáneas, disnea y depresión (Graham & Calneh, 1987; Stoll *et al.*, 1993).

1. Introducción

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

No hay casos descritos en la bibliografía de este virus afectando a perdices, debido a que se está empezando a estudiar en otras aves, no obstante se cree que está presente en otras familias de aves sin que cause patología en ellas.

IX. Reovirus

a) Etiología

Los reovirus aviares son miembros del genero *Orthoreovirus* uno de los doce géneros de la familia *Reoviridae* (Attoui *et al.*, 2000; Mertens, 2004). Son patógenos de aves que causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola (Rosenberger *et al.*, 1989).

b) Epidemiología

Han sido asociados con multitud de enfermedades en aves de corral, entre las que se incluyen afecciones respiratorias, miocarditis, hepatitis, pero una relación directa entre la presencia del virus y una enfermedad solo ha sido demostrada de manera concluyente para el síndrome de la artritis viral (tenosinovitis) que se caracteriza por una inflamación del corvejón y por lesiones en los tendones del gastrocnemio (Benavente & Martínez, 2007), sin embargo se estima que el 85-90% de los reovirus aislados no son patogénicos (Jones, 2000). La transmisión de los reovirus es tanto vertical como horizontal (Al-Mufarrej *et al.*, 1996; Menéndez *et al.*, 1975; Van der Heide & Kalbac 1975) ocurriendo la transmisión vertical en baja proporción, siendo las aves infectadas a tempranas edades por vía oral y ocasionalmente por vía respiratoria (Jones, 2000).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Los reovirus han sido aislados en pavos con tenosinovitis (Levisonh *et al.*, 1980, Clark *et al.*, 1990) si bien la relación entre la presencia del virus y la enfermedad no está muy clara en esta especie. Además de en pavos los reovirus han sido aislados en multitud de especies afectadas por diversas patologías como por ejemplo: águila audaz (*Aquila audax*), palomas, faisanes, loros, etc., siendo escasos los casos en los que la presencia del virus se ha relacionado de forma concluyente con la patología (Jones, 2000). Los reovirus son muy comunes en aves domesticas y probablemente comunes en otras especies de aves (Swayne, 2013).

1. Introducción

1.2.2. Enterobacterias

Diversos estudios han documentado la flora intestinal de aves silvestres, estando centrados la mayoría de los estudios en la prevalencia de determinadas cepas de bacterias que pueden presentar un riesgo potencial para la salud humana o los animales domésticos (Clare *et al*; 2009). Estos estudios se concentran principalmente en *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Campylobacter sp*.

a) Etiología

Salmonella sp.

Salmonella sp. es un género de bacterias que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrolla cápsula ni espora. Se encuentran fundamentalmente asociados a la flora intestinal de mamíferos, reptiles, aves, insectos siendo aislado también en alimentos y/o aguas residuales (Ewing, 1986; Pohl, 1993; Díaz, 2012)

Escheriquia coli

Escheriquia coli es un bacilo gram-negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y dentro de está al género *Escherichia* (Gyles, 2004). El género *Escheriquia* comprende 5 especies siendo *E. coli* la especie tipo y la única que tiene importancia clínica (Swayne, 2012).

Campylobacter sp.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae* (Vandamme & De Ley, 1991). Se trata de bacterias gram-negativas, pequeñas (0,3-0,6 µm de diámetro, 0,5-5 µm de ancho), no esporuladas, con una forma distintiva curva o en espiral, con aspecto de vibrio, cuando se observan a partir de cultivos jóvenes; con más de 48 horas de incubación o tras prolongada exposición al aire adoptan una forma cocoide. Presentan un flagelo no envainado único en uno o dos de sus extremos y se mueven característicamente en forma rápida y a modo de sacacorchos. Casi todas las especies son sensibles al oxígeno y sólo se pueden desarrollar en condiciones de reducción de oxígeno, habitualmente en atmósfera microaerófila (OPS/OMS Uruguay).

1. Introducción

b) Epidemiología

Las aves son vulnerables de sufrir infección a lo largo de toda su vida; pese a que los huevos presentan una barrera para protegerse frente a infecciones microbianas (Board, 1966), las bacterias pueden atravesar la cascara del huevo e infectar su contenido (Cook *et al.*, 2003). Los pollos inoculan los microorganismos a través del ambiente, a través de la alimentación proporcionada por los padres, por la ingestión de saliva de los padres y a través de los materiales del nido (Berger, Disko & Gwinner, 2003). Las aves concentradas en altas densidades en dormideros son vulnerables a la transmisión de los patógenos debido al contacto directo y por la contaminación del agua y de la comida por individuos enfermos (Rappole & Hubálek, 2006).

c) Importancia para la perdiz roja u otras galliformes

Salmonella sp.

Diversas serotipos de *Salmonella sp.* han sido encontrados tanto en aves enfermas como en aves sanas, siendo *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* el serotipo más comúnmente asociado con aves silvestres, causando cuadros clínicos en gorrións (*Passer domesticus*), tordos (*Molothrus ater*) (Faddoul *et al.*, 1966), porrones moñudos (*Aythya fuligula*) (Keymer, 1958).

Los signos clínicos de las aves enfermas por infecciones de *Salmonella sp.* incluyen letargo, plumaje erizado y tendencia a permanecer cerca de las áreas de alimentación, mostrando dificultades para ingerir el alimento (Kirkwood *et al.*, 1995). Exámenes post-mortem muestran aves con una mala condición corporal, con alimentos sin digerir, órganos internos que presentan lesiones y nódulos (Kirkwood *et al.*, 1995; Routh & Sleeman, 1995) y en ocasiones bazo e hígado engrandecidos (Faddoul *et al.*, 1966). En perdices han sido descritos casos de brotes en perdices procedentes de sueltas, no obstante se desconoce la prevalencia de *Salmonella sp.* en esta especie (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012).

Escheriquia coli

Escheriquia coli ha sido aislada en multitud de especies de aves, las cuales también incluyen passeriformes y aves acuáticas (Brittingham *et al.*, 1988; Damare *et al.*, 1979; Foster *et al.*, 1998). No obstante, la variedad patogénica de *E. coli* en aves, causa problemas en el intestino de pollos y pavos (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999), siendo considerada una causa importante de enteritis y mortalidad en perdices de granja (La

1. Introducción

Ragione *et al.*, 2004, Diaz-Sánchez *et al.*, 2013), siendo menos común en aves silvestres, pero que causa en estas mortalidad y morbilidad (Houque *et al.*, 2012).

Campylobacter sp.

Las aves son consideradas el principal reservorio para *Campylobacter sp.* debido a la temperatura corporal de estas (42°C). Aves aparentemente sanas contenían *Campylobacter jejuni*, lo que sugiere que este organismo forma parte de la flora intestinal de algunas especies de aves (Kapperud & Rosef, 1983). Sin embargo la presencia de especies de *Campylobacter sp.* parece estar asociada a la alimentación, presentando las aves insectívoras y granívoras test negativos para *Campylobacter sp.* (Waldenström *et al.*, 2002; Benskin, *et al.*, 2009), siendo la presencia de *Campylobacter sp.* en perdices silvestres y de granja escasa (Volkheimer & Wuthe 1986; Dipineto *et al.*, 2009).

1.2.3. Parásitos

La introducción de perdices de granja es una herramienta de gestión conflictiva como consecuencia de sus posibles efectos ecológicos negativos en la fauna asociada a esos hábitats (Caro *et al.*, 2014). Esto es debido a que la introducción de nuevas enfermedades y parásitos es considerado como uno de los principales problemas de la introducción de especies exóticas o procedentes de cría en cautividad (Gebhart, 1996). Puesto que las especies autóctonas no han tenido un contacto previo con estos parásitos, presentan una escasa resistencia frente a estos, lo que puede originar un importante descenso de estas poblaciones (Newton, 1998).

Estudios previos evidencian la diferencia entre los parásitos encontrados en perdices de granja y los encontrados en perdices silvestres (Millan *et al.*, 2004). Mirando helmintos las especies de monoexous son las más abundantes en perdices procedentes de granjas, mientras que en las perdices silvestres son heteroxenus (Millan, *et al.*, 2004b). Los principales parásitos en perdices procedentes de granja son especies de helmintos monoexodus como: *Eucoleus contortus*, *Heterakis gallinarum* y *Ascaridia compar*. En poblaciones silvestres especies de helmintos como *Dicrocoelium sp.*, el cestodo *Raillietina tetragona* y el nematodo *Cheilospirura gruvelli* son los predominantes (Millan *et al.*, 2004). Esto tiene unas consecuencias en las perdices, de tal manera que el contacto de las predices de granja con enfermedades endémicas de la región de suelta disminuye las probabilidades de supervivencia de estos individuos así como la

1. Introducción

introducción de nuevas enfermedades en esas regiones puede provocar una disminución de la población autóctona (Newton, 1998). Por ejemplo las reintroducciones de faisanes de granja llevadas a cabo anualmente en el Reino Unido es la principal causa del incremento de *Heterakis gallinarum* en faisanes silvestres (Draycott *et al.*, 2000) y está relacionado con la disminución de las poblaciones de perdiz gris *Perdix perdix* (Tompkins *et al.*, 2001).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en un área de unos 20 km² localizada en el término municipal de Cabrillanes, comarca de Babia, provincia de León (42°57'1"N, 6°08'5"O). Esta área se caracteriza por tener un clima oceánico, caracterizado por una temperatura media anual de 7,8° C con importantes contrastes térmicos estacionales y altas precipitaciones, superiores a los 1000 mm anuales. Los inviernos son fríos, especialmente en las áreas montañosas, en las que la nieve puede estar presente desde los meses de octubre a mayo. La orografía es escarpada con cumbres que superan los 2000 metros de altitud y una altitud media superior a los 1200 m en los valles.

El área de estudio está constituido básicamente por pastos de alta montaña, piornales y brezales e incluye cotos de caza mixtos de menor y mayor en los que no se realiza control de depredadores ni se aportan alimentación suplementaria.

Nuestra área de estudio está constituido por un coto privado mixto de menor y mayor, presentando una baja densidad de perdiz roja.



Imagen 2: Localización



Imagen 3: Localización

2.2. AVES ESTUDIADAS

Nueve perdices (*Alectoris rufa*) fueron cazadas en el noroeste de España (provincia de León, comarca de Babia) y examinadas para determinar su pureza genética y su estado sanitario.

Se midió la longitud del tarso izquierdo usando un calibre ($\pm 0,01$ mm), así como la longitud del ala. El sexo y la edad fueron determinados de acuerdo a las descripciones morfológicas de Sáenz de Buruaga *et al.*, 2001. El sexo fue confirmado posteriormente mediante análisis molecular (ver abajo punto 2.3). De cada perdiz se obtuvieron e inspeccionaron la tráquea, esófago, proventrículos, buche, molleja, hígado, intestino delgado y ciego. Muestras de estos tejidos se congelaron a -80°C para futuros análisis.



Imagen 4: Aparato digestivo de uno de los ejemplares muestreados.

2.3. ESTUDIO DE INTROGRESIÓN GENÉTICA Y SEXADO MOLECULAR

El ADN genómico total se aisló usando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Para detectar introgresión se usaron doce marcadores genéticos diagnósticos que descubren categóricamente hibridación de perdiz roja con otras especies de perdiz del género *Alectoris*. Uno de estos marcadores es mitocondrial (Blanco-Aguilar *et al.*, 2008) y el resto son marcadores nucleares (Dávila 2009, Casas *et al.*, 2012). Además, el sexo de las aves se averiguó molecularmente mediante amplificación por PCR y electroforesis de un intrón de los loci CHD-W y CHD-Z ligados al sexo en aves (Fridolfsson & Ellegren, 1999).

2.4. ANÁLISIS SANITARIOS

2.4.1. Virus

El ADN y ARN viral se aisló usando el kit NucleoSpin® TriPrep para la extracción de ADN, ARN y proteínas (Macherey-Nagel GmbH & Co. Alemania). En primer lugar se produjo la mezcla mediante vortex de la muestra con el medio de transporte con la finalidad de extraer la mayor cantidad de material genético de la muestra.

El ADN y el ARN extraído se congeló a -80 °C hasta su análisis. El material genético extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EEUU) para comprobar que se

2. Material y Métodos

encontraban en cantidad y calidad suficiente para su uso en los análisis de detección de genoma de patógenos.

Los protocolos empleados para la detección del genoma de los virus estudiados son protocolos genéricos con el fin de poder detectar una amplia variación de los diferentes virus incluyendo potenciales subtipos específicos de la especie/región.

Tabla 1 : Virus analizado, tipo de virus (ADN/ARN) y protocolo empleado para su identificación.

VIRUS	ADN/ARN	REFERENCIA	MÉTODO
Influenza A	ARN	Munster <i>et al.</i> , 2009	RT-PCR
Flavivirus (Bagazavirus, West Nile Virus, Usutu virus)	ARN	Moureau <i>et al.</i> , 2007	RT-PCT
Coronavirus (IBV)	ARN	Escutenaire <i>et al.</i> , 2007	TT-PCR
Newcastle Disease	ARN	Creelan <i>et al.</i> , 2002	RT-PCR
Herpesvirus	ADN	VanDevanter <i>et al.</i> , 1996	PCR anidada
Polyoma Virus	ADN	Phalen <i>et al.</i> , 1991	PCR conv.
Reovirus	ARN	Ke <i>et al.</i> , 2006	RT-PCR

I. Influenza A

Siguiendo el método descrito por Munster *et al.*, 2009, se realizó una RRT-PCR a tiempo real para la amplificación del gen de la matriz (M). La mezcla de reacción de 25 µl está compuesta por 10 µl de ARN, 0,5 µl de cada uno de los primers RF1073 (5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3') y RF1074 (5'-CAAAGCGTCTACGCTGCA GTCC-3') y 0,5 µl de sonda RF1293 (5'-6carboxyfluorescein-TTTGTGTTTCAGCCTC ACCGTGCC-6carboxytetramethylrhodamine-3'), 5 µl de Master Mix, 0,25 µl de RT y 8,5 µl de agua estéril libre de nucleasas.

II. Flavivirus

Siguiendo el método descrito por Moureau *et al.*, 2002, se realizó una RT-PCR a tiempo real para la amplificación de la secuencia de la región terminal N del gen NS5. La mezcla de reacción de 25 µl está compuesta por 5 µl de ARN, 1,375 µl de cada uno de los primers PF1 S (5'-GYRTBTAYAACATGATGGG-3', posiciones 8869-8888) y PF2 R (5'-GTGTCCCADCCDGC DGTCTC-3', posiciones 9, 121-9, 140), 12,5 µl de Master Mix 0,25 µl de RT polimerasa y 4,5 µl de agua estéril libre de nucleasas.

III. Coronavirus

Siguiendo el método descrito por Escutenaire *et al.*, 2007, se realizó una TT-PCR a tiempo real para la amplificación de las regiones de conservación. La mezcla de reacción de 25 µl está compuesta por 2,5 µl de ARN, 1,75 µl de solución de cada uno de

2. Material y Métodos

los primers 11F (5'-TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA-3', posiciones 15647-15671) y 13R (5'-GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC-3', posiciones 15825-15801), 12,5 µl de Master Mix, 0,5 µl de RT polimerasa y 6 µl de agua estéril libre de nucleasas.

IV. Newcastle disease

Siguiendo el método descrito por *Creelan et al.*, 2002, se realizó una RT-PCR a tiempo real para la amplificación de la región del punto de restricción de la proteína de fusión (F). La mezcla de reacción de 25 µl está compuesta por 2,5 µl de ARN, 1 µl de cada uno de los primers NDV F (5'-GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG-3', posiciones 4829-4893) y NDV R (5'-TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT-3', posiciones 5031-5008), 12,5 µl de Master Mix, 0,25 µl de RT polimerasa y 7,75 µl de agua estéril libre de nucleasas.

V. Herpesvirus

Siguiendo el método descrito por *VanDevanter et al.*, 1996, se realizó una PCR anidada para la amplificación de una región de ADN de herpesvirus. La mezcla de reacción de 50 µl para la PCR primaria está compuesta por 5 µl de ADN, 1 µl de cada uno de los primers DFA (5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3'), ILK (5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA-3') y KG1 (5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3'), 1 µl de polimerasa, 1 µl de DNTPs, 3 µl de MgSO₄, 10 µl de buffer 5x y 27 µl de agua estéril libre de nucleasas.

En la PCR secundaria realizada a partir de 5 µl de la mezcla obtenida en la PCR primaria a la cual se añadieron 1 µl de cada uno de los primers TGV (5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT-3') e IYG (5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'), 1 µl de polimerasa, 1 µl de DNTPs, 3 µl de MgSO₄, 10 µl de buffer 5x y 28 µl de agua estéril libre de nucleasas para un volumen final de 50 µl. Los productos de la PCR secundaria fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

VI. Polyomavirus

Siguiendo el método descrito por *Phalen et al.*, 1991, se realizó una PCR convencional para la amplificación de la secuencia de la región del punto de restricción de la proteína VP1, siendo esta región la seleccionada por ser la zona más homologa entre los diversos

2. Material y Métodos

polyomavirus. La mezcla de reacción de 50 µl está compuesta por 10µl de ADN, 2 µl de cada uno de los primers A (5'-CTTATGGGGAGGCTGCAGTGTT-3', posiciones 2183 a 2206) y B (5'-TACTGAAATAGCGTGGTAGGCCTC-3', posiciones 2709-2732), 12,5µl de Master Mix, 1 µl de polimerasa, 1 µl de Dntp, 2 µl de MgSO₄, 10 µl de buffer y 22 µl de agua estéril libre de nucleasas. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

VII. Reovirus

Siguiendo el método descrito por Ke *et al.*, 2006, se realizó una RT-PCR en tiempo real para la amplificación de la secuencia del gen ARVσA. La mezcla de reacción de 25 µl está compuesta por 2,5 µl de ARN, 1,25µl de cada uno de los primers REO A1, (5'-ATTACGCAGAGGCATTT-3', posiciones 799-815) y REO A2 (5'-CCCACTGCCGAATACA-3', posiciones 1039-1024), 12,5µl de Master Mix, 0,25µl de RT polimerasa y 7,25 µl de agua estéril libre de nucleasas.

La RT-PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Alemania) siguiendo las condiciones especificadas en cada uno de los protocolos.

2.4.2. Bacterias

El aislamiento y la identificación de *E.coli* y *Salmonella sp.* fue hecha mediante métodos bacteriológicos convencionales. Las muestras se mezclaron con agua de peptona y se incubaron de 18 a 24 h a 37° C, posteriormente se realizó la siembra de cada una de las muestras en un medio de cultivo selectivo para cada una de las especies objeto de estudio (Mc Conkey Sin, Genta, Cefo y Enro) (Arsenault *et al.*, 2007).

El aislamiento de *Salmonella sp.* se realizó según el método estándar descrito en la ISO 6579 (2002), cultivando las muestras en agua peptonada durante 24h y posteriormente en el medio de cultivo enriquecido Rappaport Vassiliadis (Scharlab, España) a 42°C durante 24 h y posteriormente en un medio de cultivo selectivo, usando Agar Xilose Lysine Desoxicolato (Scharlab, España) a 37° C durante 24 h.

2.5. ANÁLISIS PARASITARIOS

Se realizó un examen coprológico de las heces de cada uno de los individuos para determinar la presencia de parásitos y determinar la carga parasitaria de cada uno de los

2. Material y Métodos

ejemplares. Para llevar a cabo el recuento de huevos se empleo la cámara de MacMaster. Se pesaron 0,300 mg de heces y se depositaron en un mortero, a continuación se añadieron 10 ml de sulfato de zinc y se disgrego la materia fecal hasta que esta no presentara grumos. Se filtro la suspensión fecal y se cargaron las cámaras de conteo de MacMaster empleando una pipeta o un cuentagotas,. Una vez cargadas se dejaron reposar durante cinco minutos y se examino la muestra bajo un microscopio y se procedió al recuento del numero de huevos que hay dentro de la rejilla (Wetzel, 1951).

3. RESULTADOS

3.1. AVES ESTUDIADAS

Ref. ave	662	663	664	667	668	669	670	671	672
Ala(cm)	16	14,4	16,0	14,3	14,4	14,0	15,5	14,8	14,5
Tarso(mm)	47,1	46,7	54,2	44,0	44,1	44,3	45,0	44,05	43,7
Sexo	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♀	♀
Edad	Adulto	Joven	Adulto	Adulto	Adulto	Joven	Adulto	Joven	Joven

Las perdices incluidas en el estudio fueron clasificadas en dos categorías según su edad. Se determinó la edad de los 9 ejemplares muestreados, siendo el 44% (4/9) ejemplares jóvenes y el 56% (5/9) ejemplares adultos. Así mismo, se determinó el sexo mediante técnicas moleculares en los 9 ejemplares, siendo la sex ratio del grupo analizado 3:1 (77% hembras y 23% machos) (Figuras 1 y 2).

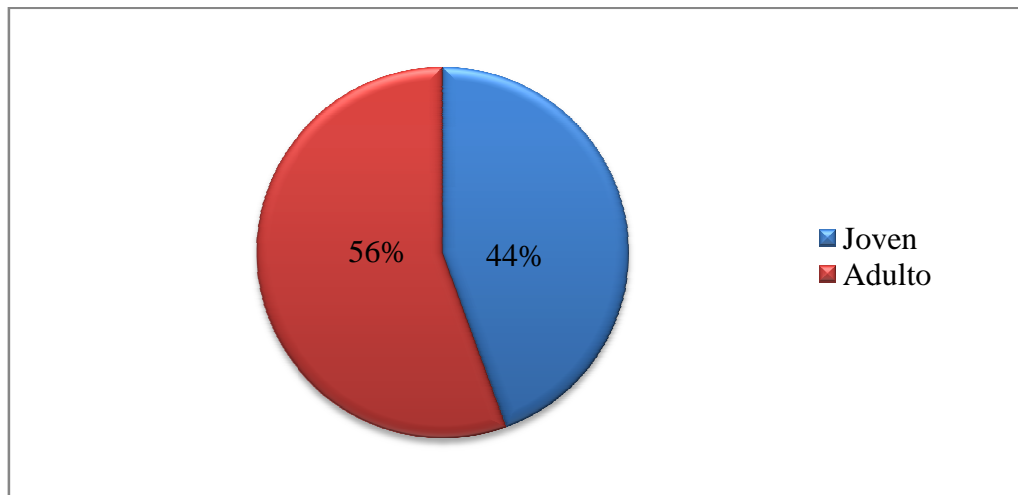


Figura 1: Edad de las perdices muestreadas.

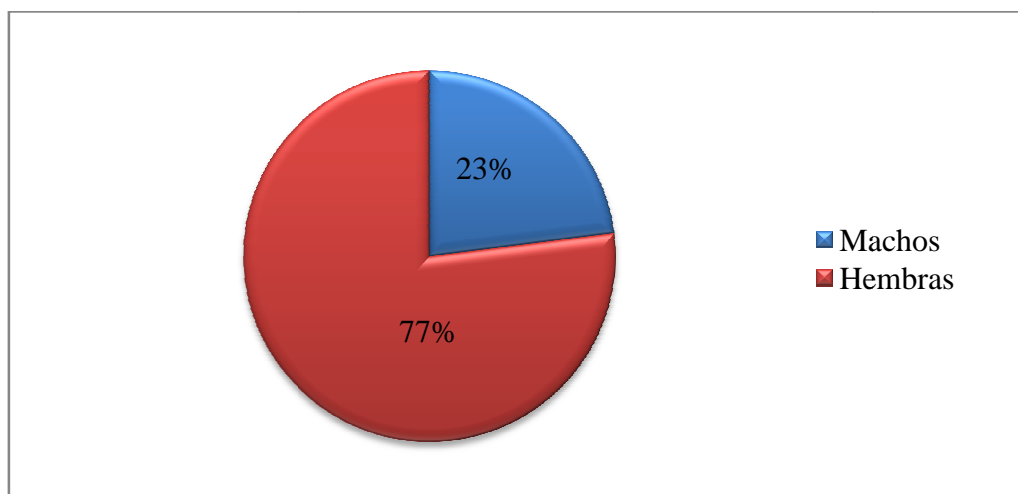


Figura 2: Porcentaje de machos y hembras de las perdices muestreadas.

3. Resultados

3.2. INTROGRESIÓN GENÉTICA

No se encontró introgresión genética en ninguna de las perdices analizadas en el presente estudio

3.3. PATÓGENOS

3.3.1. Virus

Ref. ave	662	663	664	667	668	669	670	671	672
Influenza A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bagaza virus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
West Nile Virus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Usutuvirus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Coronavirus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Newcastle Disease	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Herpesvirus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Polyomavirus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Reovirus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3.3.2. Bacterias

Ref. ave	662	663	664	667	668	669	670	671	672
<i>Salmonella sp.</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

3.3.3. Parásitos

Ref. ave	662	663	664	667	668	669	670	671	672
Propagulos	4730	4489	8389	7481	12527	3654	8198	5241	227

Se determino la especie de los propagulos encontrados perteneciendo estos a las siguientes especies: *Syngamus traquea*, Coccidios, *Trichostrongylus sp.*

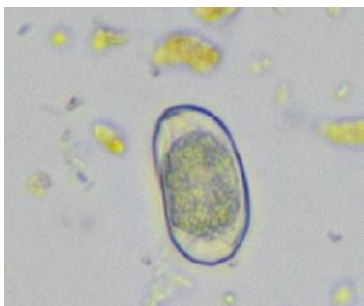


Imagen 5: *Syngamus traquea*

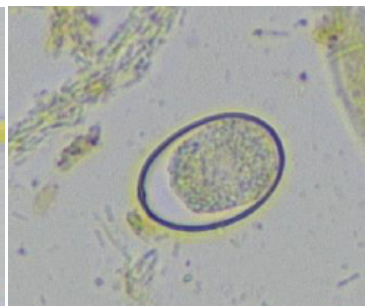


Imagen 6: Coccidios

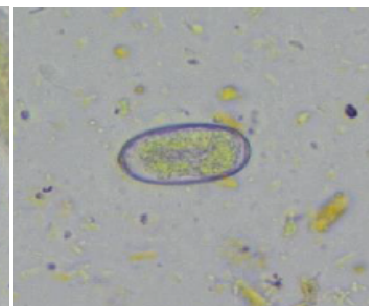


Imagen 7: *Trichostrongylus sp.*

4. DISCUSIÓN

4.1. INTROGRESIÓN GENÉTICA

De los 9 ejemplares analizados ningún ejemplar presento introgresión genética.

La Península Ibérica fue una de las áreas más importantes de Europa que no sufrió la glaciación durante el Pleistoceno (Ferrero *et al.*, 2011) debido a su posición geográfica y su localización entre el Océano Atlántico y el mar Mediterráneo, siendo lugar de refugio de numerosas especies.

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es endémica de la región oeste del Mediterráneo. Las poblaciones de esta especie han sufrido un declive poblacional a lo largo de su área de distribución por lo que en las áreas donde la especie ha sido cazada intensamente se ha suplido esta disminución poblacional a través de la introducción de perdices criadas en cautividad, las cuales incluyen muchas veces híbridos con *A. chukar* (Blanco-Aguilar *et al.* 2008; Martínez-Fresno *et al.* 2008; Barbanera *et al.* 2010, Ferrero *et al.*, 2011). A pesar de estos datos que ponen de manifiesto la introducción de ejemplares híbridos en el medio natural, en los ejemplares estudiados no se ha detectado hibridación por lo que podemos concluir de forma preliminar que podríamos encontrar ante una de las pocas poblaciones de la Península Ibérica libre de hibridación.

4.2. PATÓGENOS

No se detecto la presencia de patógenos en ninguno de los nueve ejemplares analizados en el presente estudio.

4.2.1. Virus

I. Influenza aviar

Diversos estudios realizados sobre diversas especies concluyeron que pavos, faisanes y codornices japonesas eran más susceptibles a sufrir infecciones causadas por virus de influenza A transmitidas por las aves acuáticas que los pollos (Humberd *et al.*, 2006, Perea *et al.*, 2003), no obstante escasos estudios han sido realizados sobre la susceptibilidad de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) a padecer dicha enfermedad. Uno de estos estudios realizado por Bertran *et al.*, 2011, demuestran la alta susceptibilidad de las perdices a padecer infecciones causadas por virus de HPAI, por lo que la perdiz roja puede constituir un elemento potencial de diseminación y expansión del virus en un brote de HPAI, puesto que no comienza a mostrar signos clínicos hasta el día 5 pi aunque produce excreción desde el día 3. Por otra parte, en el mismo estudio se

4. Discusión

concluyo que la perdiz roja no constituye un reservorio del virus de LPAI debido a la ausencia de signos clínicos y lesiones observadas en las aves infectadas, así como por la poca replicación y excreción del virus.

II. Bagaza virus

El primer caso de BAGV descrito en Europa, está asociado con una elevada mortandad de perdices y faisanes ocurridas en áreas cinegéticas del sur de España en 2010 (Agüero *et al.*, 2011). Estudios llevados a cabo por Llorente *et al.*, 2015 han demostrado que la perdiz roja es susceptible a las infecciones de BAGV, y que esta es un hospedador adecuado para la transmisión del virus, por lo que es una especie interesante para controlar la circulación del virus en España.

III. West Nile virus

Estudios de Wunschmann *et al.*, 2006, registraron un brote de enfermedad clínica de WNV originado en América del Norte en perdices chukar (*Alectoris chukar*). Estos datos llevaron a Sotelo *et al.*, 2011, a investigar la susceptibilidad y sensibilidad a la infección por WNV en perdiz roja experimentalmente infectadas. Los resultados demostraron que la especie es susceptible a la infección por WNV tal y como ha sido previamente demostrado en otras especies de aves silvestres en Europa (Pérez-Ramírez *et al.*, 2014).

IV. Usutu virus

El primer caso descrito de USUV en Europa se produjo en Italia en 1996, posteriormente se produjeron otros brotes en centro Europa, momento a partir del cual se considero que el virus se encontraba circulando por Europa.

Diversos estudios serológicos han demostrado que puede infectar a multitud de especies de aves, habiéndose registrado casos de perdiz roja infectada por USUV (Calzolari *et al.*, 2011), no obstante no hay estudios realizados sobre los efectos de la infección por USUV en perdiz roja. Las aves infectadas en la mayoría de los casos cursan la enfermedad sin mostrar signos clínicos, a pesar de que se le atribuye multitud de muertes en aves (Pauli *et al.*, 2014). De entre las diversas especies de aves, los mirlos (*Turdus merula*) son los que han mostrado mayor susceptibilidad al virus con elevadas tasas de mortalidad (Ashraf *et al.*, 2015). En España en 2012 se detecto el virus en 2

4. Discusión

zorzales (*Turdus philomelos*) que presentaban daños en el sistema nervioso central (Höfle *et al.*, 2013).

V. Coronavirus

El virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), presenta un amplio rango de hospedadores, entre los que se encuentran aves pertenecientes al orden de las galliformes y otras pertenecientes a otros órdenes.

Han sido registrados brotes de coronavirus en granjas de faisanes en el Reino Unido, en los que se produjo una elevada mortalidad, sin que se apreciaran evidentes signos clínicos de la afección. También se ha detectado el virus en perdices en zonas próximas a granjas de aves domesticas (Cavanagh, 2005).

En nuestros aves analizadas no se ha detectado presencia de coronavirus, pero sería importante el estudio de esta enfermedad en aves silvestres, así como determinar la importancia que esta podría llegar a tener en las granjas de cría de perdiz roja y su posible introducción en el medio natural a través de la suelta de aves en el medio silvestre.

VI. Newcastle disease

Kaleta y Baldauf (1998) evidenciaron que la infección natural o experimental con el virus de Newcastle se ha descrito en 27 de 50 órdenes de aves, sugiriendo además que a pesar de no evidenciarse en todos los órdenes, todos podrían ser susceptibles de infección. La mayor susceptibilidad a la infección ha sido encontrada en Phasianiformes, Psittaciformes, Struthinioformes y Columbiformes. La susceptibilidad en aves cinegéticas ha sido estudiada mediante infección experimental. Geral *et al.*, 1976 comprobaron que la perdiz roja fue la especie más resistente a la infección experimental en comparación con la perdiz griega y el faisán común.

En España estudios en fase de desarrollo han obtenido resultados de seroprevalencias del 14% en perdices y del 64,5% en paloma bravía (Lima, 2014). Sin embargo en un estudio realizado en diferentes especies de aves rapaces (Höfle *et al.*, 2002) se determinó una prevalencia del 17,1% de paramixovirus tipo 1.

VII. Herpesvirus

Diversos estudios evidencian la susceptibilidad de codornices, pavos, faisanes y algunas especies de patos y gansos a infecciones causadas por herpesvirus. Al contrario otras

4. Discusión

especies como gorriones, perdices, palomas y los pavos reales son probablemente refractarios.

Se han registrado brotes naturales en bandadas comerciales de codornices japonesas. La mortalidad encontrada en pavos durante varios brotes ocurridos durante el periodo 1997-2002 osciló entre el 40% y el 80%, no obstante la virulencia de los herpesvirus es difícil de determinar (Swayne, 2013).

VIII. Polyomavirus

Los principales estudios llevados a cabo sobre este virus están relacionados con Psitacidos, en los cuales puede originar un 100% de mortalidad en las aves afectadas (Krautwald *et al.*, 1989). Sin embargo apenas existen estudios sobre los efectos de la infección por polyomavirus en otras especies, no obstante se considera que el virus está presente en otras familias de aves sin causar ningún tipo de patología en ellas. En España se ha aislado en aves de compañía (Ramis *et al.*, 1998) y en una grajilla (*Corvus monedula*) que falleció durante un brote por *Salmonella hassarek* en estorninos (John *et al.*, 2006).

IX. Reovirus

Los reovirus han sido aislados en multitud de especies afectadas por diversas patologías como por ejemplo: águila audaz (*Aquila andax*), palomas, faisanes, loros, etc., siendo escasos los casos en los que la presencia del virus se ha relacionado de forma concluyente con la patología (Jones, 2000), siendo solo relacionando de manera directa en pavos con tenosinovitis (Levisonh *et al.*, 1980, Clark *et al.*, 1990) si bien la relación entre la presencia del virus y la enfermedad no está muy clara en esta especie.

Los reovirus son muy comunes en aves domesticas y probablemente comunes en otras especies de aves (Swayne, 2013).

4.2.2. Bacterias

Basándonos en los resultados, podemos confirmar que la presencia de bacterias hallada se corresponde con lo que cabría esperar en perdices silvestres. La ausencia de crecimiento de *E. coli*, indicaría que en condiciones naturales esta bacteria no formaría parte de la flora del aparato digestivo de las aves granívoras (Waldenström *et al.*, 2002), y que en zonas sin sueltas de perdices aunque posiblemente con manejo hay presencia de enterobacterias aunque con una baja prevalencia (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012).

4. Discusión

No se encontró *Salmonella sp.*, este resultado concuerda con estudios previos que ponen de manifiesto la baja prevalencia o ausencia de *Salmonella sp.* en aves sanas, tanto en especies cinegéticas, como aves acuáticas (Brittingham *et al.*, 1988; El-Ghareeb *et al.*, 2009). No obstante *Salmonella sp.* es uno de los patógenos más importantes de aves de granjas (Arsenault *et al.*, 2007), por lo que puede suponer un riesgo para las aves silvestres tras la liberación de aves de granja en el medio natural.

4.2.3. Parásitos

La demanda de perdices con fines cinegéticos ha hecho que se incremente la necesidad de reforzar las poblaciones naturales con animales procedentes de granjas, para así poder mantener el número de capturas. La introducción de estos animales en el medio natural supone la introducción de nuevos parásitos en este. Autores como Millán *et al.*, 2004b, encontraron diferencias entre las poblaciones de parásitos entre perdices rojas silvestres y procedentes de granjas.

Todas las especies encontradas en nuestro estudio han sido descritas previamente parasitando perdices rojas (Millán *et al.*, 2004), la diversidad de especies encontrada es inferior a la encontrada por otros autores (Calvete *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2004), siendo la prevalencia y abundancia inferiores a las de esos estudios.

Tres especies (*Coccidios*, *Trichostrongylus sp.*, *Syngamus traquea*) fueron identificadas en nuestro estudio, las cuales son propias de poblaciones naturales (Millán, 2009), indicando nuestros resultados que las poblaciones silvestres de perdiz roja presentan una menor diversidad de parásitos.

5. CONCLUSIONES

1. La ausencia de introgresión genética en los ejemplares examinados permite suponer que nos encontramos con una población de perdiz roja (*Alectoris rufa*) libre de intogresión genética.
2. El estado sanitario de este grupo estudiado es el esperado en poblaciones silvestres de perdiz roja (*Alectoris rufa*) cuando se encuentran en bajas densidades y en ausencia de manejo.

6. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo Beiras, A.M. (2010). Avian infectious bronchitis: diagnosis and control. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504, 2010. Volumen 11(3).

Aebischer, N.J., Lucio, A. (1997). Red-legged partridge *Alectoris rufa*. En, W.J.M. Hagemeijer & M.J. Blair (Eds): The EBCC atlas of European Breeding birds: Their Distribution and Abundance, pp. 208-209, T & A.D. Poyser, London.

Agüero, M., Fernández-Pinero, J., Buitrago, D., Sánchez, A., Elizade, M., San Miguel, E., Villalba, R., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.A. (2011). Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. Emerging Infectious Diseases 17(8), pp. 1498-1501.

Albassam, M.A., Winterfield, R.W., Thacker, H.L.(1986). Comparison of the neuropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. Avian Diseases (30), pp. 468-476.

Alexander, D.J. (1987). Avian influenza: historical aspects. In: Proceedings of the second International Symposium on Avian Influenza, 1986. University of Wisconsin, Madison, pp. 4-13.

Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. Veterinary Microbiology 74, pp. 3-13.

Alexander, D.J. (2003). A review of avian influenza in different bird species. Veterinary Microbiology 74, pp. 3-13.

Alexander, D.J., Senne D.A. (2008). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, pp. 135-141.

6. Bibliografía

Al-Mufarrej, S.I., Savage, C.E., Jones, R.C. (1996). Egg transmission of avian reoviruses in chickens: comparison of a trypsin-sensitive and a trypsin-resistant strain. *Avian Pathology* 25(3), pp. 469-480.

Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Normand, V., Boulianne, M. (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 81(4), pp. 250-264.

Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., Shengbo Cao, S. (2015). Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses* 7, pp. 219-238.

Atanassova, V., Ring, C. (1999). Prevalence of *Campylobacter* sp. In poultry and poultry meat in Germany. *International Journal Food Microbiology* 51, pp. 187-190.

Bagust, T.J. (1986). Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in chickens. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathology* 15, pp. 581-595.

Bagust, T.J., Johnson, M.A. (1995). Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathology* 24, pp. 373-391.

Barbanera, F., Pergams, O.R.W., Guerrini, M., Forcina, G., Panayides, P., Dini, F. (2010). Genetic consequences of intensive management in game birds. *Biological Conservation* 143, pp. 1259-1268.

Becker, W.B. (1966). The isolation and classification of tern virus: influenza virus A/tern/South Africa/1961. *Journal of Hygiene* 64, pp. 309-320.

Becker, N., Jost, H., Ziegler, U., Eiden, M., Hoper, D., Emmerich, P., Fichet-Calvet, E., Ehichioya, D.U., Czajka, C., Gabriel, M., Hoffmann, B., Beer, M., Tenner-Racz, K., Racz, P., gunther, S., Wink, M., Bosch, S., Konrad, A., Pfeffer, M., Groschup, M.H., Schmidt-Chanasit, J. (2012). Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One* 7(2):e32604.doi:10.1371/journal.pone.0032604.

6. Bibliografía

Benskin, C.McW. H., Wilson, K., Jones, K., Hartley, I.R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews* 84, pp. 349-373.

Berger, S., Disko, R., Gwinner, H. (2003). Bacteria in starling nests. *Journal Of Ornithology* 144, pp. 317-322.

Bernabeu, R.L., (2000). Evaluación económica de la caza en Castilla-La Mancha. Ph.D. thesis. Castilla-La Mancha University, Spain.

Bernier, G., Morin, M., Marsolais, G. (1981). A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. *Avian Diseases* 25, pp. 1083-1092.

Bertran, K., Pérez-Ramírez, E., Busquets, N., Dolz, R., Ramis, A., Darji, A., Abad, F.X., Valle, R., Chaves, A., Vergara-Alert, J., Barral, M., Höfle, U., Majó, N. (2011). Pathogenesis and transmissibility of highly (H7N1) and low (H7N9) pathogenic avian influenza virus infection in red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Veterinary Research* 42(24).

BirdLife International/EBCC (European Bird Census Council) (2000). European bird populations: estimates and trends. Cambridge, UK: BirdLife International (BirdLife Conservation Series No. 10).

Blanco-Aguiar, J.A., Virgós, E., Villafuerte, R. (2003). La perdiz roja (*Alectoris rufa*). In: Atlas de las Aves Reproductoras de España (eds Martí R., Del Moral, J.C.), pp. 212-213, Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Sociedad Española de Ornitología, Madrid.

Blanco-Aguiar J.A., Gonzalez-Jara P., Ferrero M.E. *et al.* (2008). Assessment of game restocking contributions to anthropogenic hybridization: the case of the Iberian red-legged partridge. *Animal Conservation* 11, pp. 535-545.

6. Bibliografía

- Blázquez, A.B., Escribano-Romero, E., Martín-Acebes, M.A., Petrovic, T., Saiz, J.C. (2015). Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity. *Virology* 482, pp. 67-71.
- Board, R. G. (1966). Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 29, pp. 319-341.
- Brittingham, M. C., Temple, S. A., Duncan, R. M. (1988). A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases* 24, pp. 299-307.
- Calzolari, M., Gaibani, P., Bellini, R., Defilippo, F., Pierro, A., Albieri, A., Mailoli, G., Luppi, A., Rossini, G., Balzani, A., *et al.* (2012). Mosquito, bird, and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna region (Italy) in 2010. *PLoS One* 2012, 7, e38058.
- Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D., Gough, R.E. (1999). Cocirculation of four types of infectious bronchitis virus (793/B 624/I B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology* 28, pp. 587-592.
- Capua, I., Alexander, D.J. (2002). Avian influenza and human health. *Acta Tropica* 83, pp. 1-6.
- Caro, J., Delibes-Mateos, M., Vicente, J., Arroyo, B. (2014). A quantitative assessment of the release of farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*) for shooting in central Spain. *European Journal of Wildlife Research* 60(6), pp. 919-926.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviridae: a review of coronaviruses and toroviruses, in: Schmidt A., Wol. M.H. (Eds.), *Coronaviruses with special emphasis on first insights concerning SARS*. Basel, Birkhäuser, pp. 1-54.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. Review. *Avian Pathology* 34, pp. 439-448.

6. Bibliografía

Cavanagh, D., Naqi, S.A. (1997). Infectious Bronchitis. In Diseases of Poultry, 10th edition, B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, Y.M. Sif, ed., Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 511-526.

Cavanagh, D., Mawditt, K., Welchman, D. de B., Britton, p., Gough, R.E. (2002). Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. Avian Pathology 31, pp. 81-93.

Clare, McW., Benskin, H., Wilson, K., Jones, K., Hartley, I., (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. Biological Reviews 84, pp. 349-373.

Clark, F.D., Ni, Y., Collisson, E.W., Kemp, M.C. (1990). Characterisation of avian reovirus strain-specific polymorphisms. Avian Disease 34, pp. 304-314.

Commonwealth of Australia (2006). Hygiene protocols for the prevention and control of diseases (Particular beak and feather disease) in Australian birds. Avian polyomavirus infection. Australian government: department of the environment and heritage.

Cook, M. I., Beissinger, S. R., Toranzos, G. A., Rodriguez, R. A., Arendt, W. J. (2003). Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of nonincubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270, pp. 2233-2240.

Creelan, J.L., Graham, D.A., McCullough, S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Pathology 31, pp. 493-499.

Damaré, J.M., Hussong, D., Weiner, R.M., Colwell, R.R. (1979). Aerobic and facultatively anaerobic bacteria associated with the gut of Canada geese (*Branta canadensis*) and whistling swans (*Cygnus columbianus columbianus*). Applied Environmental Microbiology 38, pp. 258-265.

6. Bibliografía

Da Silva, G.M., Da Silva, C.M.F., Bruno, S.F., Abreu, D.L.d.C. (2004). Enterobacteriaceae identification of the intestinal microbiota in laying hens (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) from Lohmann S.L.S. lineage. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria* 11, pp. 153-155.

Davis, R.B., Bozeman, L.H., Gaudry, D., Fletcher, O.J., Lukert, P.D. and Dykstra, M.J. (1981). A viral disease of fledgling budgerigars. *Avian Diseases* 25, pp. 179-183.

Davison, A. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 86, pp. 69-88.

Delibes, J. (1992). Gestión de los cotos de Perdiz Roja. In: Aedos (Ed.), *La perdiz roja. Gestión del hábitat*. Fundación "La Caixa", Barcelona, pp. 141-146.

Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 30, pp. 299-316.

Díaz, P., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R. *et al.* (2007). Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophorin daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Veterinary Parasitology* 149, pp. 285-289.

Díaz, S. (2012). *E. coli*, *Salmonella spp.* *Campylobacter spp.* En fauna silvestre de Castilla- La Mancha: implicaciones sanitarias y de salud pública. PhD Thesis.

Díaz-Sánchez, S., Mateo Moriones, A., Casas, F., Höfle, U. (2012). Prevalence of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Campylobacter sp.* in the intestinal flora of farm reared, restocked and wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*): is restocking using farm-reared birds a risk?. *European Journal of Wildlife Research* 58, pp. 99-105.

Dipineto L, Gargiulo A, Bossa LMD, Rinaldi L, Borrelli L, Santaniello A, Menna LF, Fioretti A (2009) Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in partridges (*Perdix perdix*). *Letters in Applied Microbiology* 49, pp. 351-353.

6. Bibliografía

El-Ghareeb, W.R., Smulders, F.J.M., Morshdy, A.M.A., Winkelmayr, R., Paulsen, P. (2009). Microbiological condition and shelf life of meat from hunted game birds. *European Journal of Wildlife Research* 55, pp. 317-323.

Escribano-Romero, E., Gamino, V., Merino-Ramos, T., Blázquez, A.B., Martín-Acebes, M.A., Jiménez de Oya, N., Gutiérrez-Guzmán, A.V., Escribano, J.M., Höfle, U., Saiz, J.C. (2013). Protection of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) against West Nile virus (WNV) infection after immunization with WNV recombinant envelope protein E (rE). *Vaccine* 31, pp. 4523-4527.

Escutenaire, S., Mohamed, N., Isaksson, M., Thorén, P., Klingeborn, B., Belák, S., Berg, M., Blomberg, J. (2007). SYBR green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of Virology* 152, pp. 41-58.

Ewing, W.H. 1986. The genus *Escherichia*. En: Ewing W.H., eds Edward and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th edition, Elsevier Science, New York, pp. 93-134.

Faddoul, G.P., Fellows, G.W. & Baird, J. (1966). A survey on the incidence of salmonellae in wild birds. *Avian Diseases* 10, pp. 89-94.

Ferh, R.A., Perlman, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis in: Helena Jane Maier *et al.* (eds), *Coronaviruses: methods and protocols*.

Geral, M. F., Lautie, R., Bodin, G. (1976). Study of the experimental infection of game birds (pheasant, red legged partridge and common partridge) with Newcastle disease virus. *Revue de Médecine Vétérinaire* 127, pp. 1537-1574.

Ferrero, M.E., Blanco-Aguilar, J.A., Loughheed S., Sanchez-Barbudo, I., G. de Nova, P.J., Villafuerte, R., Dávila, J.A. (2011). Phylogeography and genetic structure of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*): more evidence for refugia within the Iberian glacial refugium. *Molecular Ecology* 20, pp. 2628-2642.

6. Bibliografía

Foster, G., Ross, H.M., Pennycott, T.W., Hopkins, G.F., McLaren, I.M. (1998). Isolation of *Escherichia coli* 186:K61 producing cyto-lethal distending toxin from wild birds of the finch family. *Letters in Applied Microbiology* 26, pp. 395-398.

Gamino, V., Gutiérrez-Guzmán, A.V., Fernández de Mera, I.G., Ortiz, J.A., Durán Martín, M., de la Fuente, J., Gortázar, C., Höfle, U. (2012). Natural Bagaza virus infection in game birds in southern Spain. *Veterinary Research* 43(65).

Gelb, J., Keeler, C.L., Nix, W.A., Rosenberger, J.K., Cloud, S.S. (1997). Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 41, pp. 661-669.

Geral, M.F., Lautie, R., Bodin, G. (1976). Study of the experimental infection of game birds (pheasant, red legged partridge and common partridge) with Newcastle disease virus. *Revue de Médecine Vétérinaire* 127, pp. 1537-1574.

Glünder, G. (1989). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in wild birds. *Avian Pathology* 18, pp. 685-695

Gough, R.E., Cox, W.J., Winkler, C.E., Sharp, M.W., Spackman, D. (1996). Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. *Veterinary record* 138, pp. 208-209.

Graham, D.L., Calnek, B.W. (1987). Papovavirus infection in hand-fed parrots: virus isolation and pathology. *Avian Diseases* 31, pp. 398-410.

Gyles, C. (2004). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International (Eds), Wallingford, USA

Höfle, U., Gamino, V., Fernández de Mera, I., Mangold, A., Ortiz, J.A., Fuente, J. (2013). Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 19, pp. 1173-1175.

6. Bibliografía

Hughes, A., Rivailler, P. (2007). Phylogeny and recombination history of gallid herpesvirus 2 (Marek's disease virus) genomes. *Virus Research* 130, pp. 28-33.

Hughes, L.A., Savage, C., Naylor, C., Bennett, M., Chantrey, J., Jones, R. (2009). Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations on northern England. *Emerging Infectious Diseases* 15(7), pp. 1091-1094.

Humberd, J., Guan, Y., Webster, R.G. (2006). Comparison of the replication of influenza A viruses in Chinese ring-necked pheasants and chukar partridges. *Journal of Virology* 80(5), pp. 2151-2161.

Houque, M.A., Burgess, G.W., Greenhil, A.R., Hedlefs, R., Skemat, L.F. (2012). Causes of morbidity and mortality of wild aquatic birds at Billabong Sanctuary, Townsville, North Queensland, Australia. *Avian diseases* 56, pp. 249-256.

ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* sp.

Jiménez, R., Hodar, J.A., Camacho, I. (1991). La alimentación de la perdiz común (*Alectoris rufa*) en otoño-invierno en el sur de España. *Gibier Faune Sauvage* 8, pp. 43-54.

Johne, R., Fernández-de-Luco, D., Höfle, U., Müller, H. (2006). Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology* 87(5), pp. 1189-1195.

Jones, R.C. (2000). Avian reovirus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19 pp. 614-625.

Kaleta, E.F., Baldauf, C. (1988). Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle Disease*. Kluwer Academic Publisher, Boston, pp. 197-246.

6. Bibliografía

- Kapperud, G., Rosef, O. (1983). Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia spp.*, and *Salmonella spp.* In Norway. Applied and Environmental Microbiology 45, pp. 375-380.
- Ke, G.M., Cheng, H.L., Ke, L.Y., Ji, W.T., Chulu, J.L.C., Liao, M.H., Chang, T.J., Liu, H.J. (2006). Development of a quantitative light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. Journal of Virological Methods 133, pp. 6-13.
- Keymer, I.F. (1958). A survey and review of the causes of mortality in British birds and the significance of wild birds as disseminators of disease. The Veterinary Record 70, pp. 713-720.
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B.(2011): Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9th ed. Academic Press, San Diego , P. 1009.
- Kirkwood, J.K., Holmes, J.P. & Macgregor, S. (1995). Gardenbird mortalities. The Veterinary Record 136, pp. 372.
- Krautwald, M.E., Mueller, H., Kaleta, E.F. (1989). Polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): clinical and aetiological studies. Zentralbl. Veterinarmed. B. 36, pp. 459-467.
- Kuno G., Chang G.J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou and Zika viruses. Archives of Virology 152, pp. 687-696.
- La Ragione RM, Cooley WA, Parmar DDG, Ainsworth HL (2004) Attaching and effacing Escherichia coli O103: K+:H- in redlegged partridges. Vet Rec 155, pp. 397-398.
- Levisohn, S., Gur-Lavie, A., Weisman, J. (1980). Infectious synovitis in turkeys: isolation of tenosynovitis like agent. Avian Pathology 9, pp. 1-4.

6. Bibliografía

Lima, J.F. (2014). Aspectos sanitarios de la producción y explotación de aves cinegéticas: aPMV-1. Trabajo fin de máster UCLM/IREC.

Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., et al. (2005). Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). Journal of General Virology 86, pp. 719-725.

Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Fernández-Pinero, Maia Elizalde, J., Jordi Figuerola, J, Soriguer, R., Jiménez-Clavero, M.A. (2015). Bagaza virus is pathogenic and transmitted by direct contact in experimentally infected partridges, but is not infectious in house sparrows and adult mice. Veterinary Research 2015, pp. 46-93.

Malkinson, M, Banet, C. (2002). The role of birds in the ecology of West Nile Virus in Europe and Africa. Curr. Top. Microbiol Immuno, 267, pp. 309-322.

MAAMA (2013). Informe 2012 sobre el estado del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad en España. MAAMA, Madrid.

Mamom, T., Dumrongsoonthornchai, P., Trogwongsa, L. (2009). Avian polyomavirus infection in non-budgerigar psittacine birds in Thailand- A case report. Thai Journal of Veterinary Medicine 40(1), pp. 75-80.

Manarolla, G., Bakonyi, T., Gallazzi, D., Crosta, L., Weissenböck, H., Dorrestein, G.M., Noeotny, N. (2010). Usutu virus in wild birds in northern Italy. Veterinary Microbiology 141(1-2), pp. 159-163.

Marek, J. (1907). Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 15, pp. 417-421.

Martín-Acebes, M.A., Saiz, J.C. (2012). West Nile virus: a re-emerging pathogen revisited. Worl Journal of Virology 1(2), pp. 51-70.

6. Bibliografía

Martinez-Fresno M., Henriques-Gil N., Arana P. (2008). Mitochondrial DNA sequence variability in red-legged partridge, *Alectoris rufa*, Spanish populations and the origins of genetic contamination from *A. chukar*. *Conservation Genetics* 9, pp. 1223-1231.

Matsusaki, S.A., Katayama, K., Hagok, H., Yamagota, K., Tanaka, T., Yamami, T., Uchida, W. (1986). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among wild and domestic animals in Yamaguchi prefecture. *Microbiology Immunology* 30, pp. 1317-1322.

May; H.G., Tittoler, R.P. (1925). Tracheolaryngotracheitis in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 67, pp. 229-231.

McGeoch, D.J., Rixon, F.J., Davison, A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research* 117, pp. 90-104.

Menendez, N.A., Calnek, B.W., Cowen, B.S. (1975). Experimental egg-transmission of avian reovirus. *Avian Diseases* 19, pp. 104-111.

Millán, J. (2009). Diseases of the Red-Legged Partridge (*Alectoris rufa* L.): a Review. *Wildlife Biology in Practice* 5(1), pp. 70-88.

Millan, J., Gortazar, C., Martin-Mateo, M.P., Villafuerte, R. (2004). Comparative survey of the ectoparasite fauna of wild and farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*), with an ecological study in wild populations. *Parasitology Research* 1, pp. 79-85.

Millán, J., Gortázar, C., Villafuerte, R. (2004b). A comparison of the helminth faunas of wild and farm-reared red-legged partridges. *Journal of Wildlife Management* 68(3), pp. 701-707.

Moureau, G., Temmam, S., Gonzalez, J.P., Charrel, R.N., Grard, G., de Lamballerie, X. (2007). A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 8.

6. Bibliografía

Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Bestebroer, T.M., Guldemeester, J., *et al.* (2009). Practical considerations for high-throughput influenza A virus surveillance studies of wild birds by use of molecular diagnostic tests. *Journal of Clinical Microbiology* 47(3), pp. 666-673.

Nair, V. (2005). Evolution of Marek's disease: A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *The Veterinary Journal* 170, pp. 175-183.

OIE (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.3.2. Bronquitis infecciosa aviar. [online]. Paris: OIE, <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

OIE (2012). Manual terrestre de la OIE 2012. Capítulo 2.3.14. Enfermedad de Newcastle. [online]. Paris: OIE, <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

OIE (2015). Manual terrestre de la OIE 2015. Capítulo 2.3.4. Influenza aviar. [online]. Paris: OIE <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

OPS/OMS Uruguay: www.bvsops.org.uy/pdf/campylobacter.pdf

Osterrieder, N., Kamil, J., Schumacher, D., *et al.* (2006). Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature Rev Microbiol.* 4, pp. 283–294.

Pass, D.A., Prus, S.E., Riddell, C. (1987). A Papova- Like Virus Infection of Splendid Parakeets (*Neophema splendida*). *Avian Diseases* 31, pp. 680-684.

Pauali, G., Bauerfeind, U., Blumel, J., Burger, R., Drosten, C., Groner, A., Gurtler, L., Heiden, M., Hilderbrandt, M., Jansen, B., Offergeld, R., Seitz, R., Schlenkrich, U., Schottstedt, V., Strobel, J., Willkommen, H. (2014). Usutu virus. *Transfus. Med. Hemother.* 41(1), pp. 73-82.

6. Bibliografía

Pereira, H.G., Tumova, B., Law, V.G. (1965). Avian influenza A viruses. Bull. WHO 32, pp. 855-860.

Perez, D.R., Webby, R.J., Hoffmann, E., Webster, R.G. (2003). Land-based birds as potential disseminators of avian mammalian reassortant influenza A viruses. Avian Diseases 47(3 Suppl), pp.1114-1117.

Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.A. (2014). Experimental infections of wild birds with West Nile virus. Viruses 6, pp. 752-781.

Peterson, AT., Vieglaiss D.A., Andreade, J.K. (2003). Migratory birds model as critical transport agents for West Nile Virus in North America. Vector Borne Zoonotic Dis 3(1), pp. 27-37.

Phalen, D.N., Wilson, V.G., Graham, D.L. (1991). Polymerase chain reaction assay for avian polyomavirus. Journal of Clinical Microbiology 29(5), pp. 1030-1037.

Pohl, P. (1993). Les souches pathogenes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. Ann méd vét 137, pp. 325-333.

Rahaus, M., Wolff, M. H. (2005). A survey to detect subclinical polyomavirus infections of captive psittacine birds in Germany. Veterinary Microbiology 105, pp. 73-76.

Ramis, A., Latimer, K.S., Gibert, X., Campagnoli, R. (1998). A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus, and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Avian Pathology 27(1), pp. 43-50.

Rappole, J. H., Hubálek, Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus. Journal of Applied Microbiology 94, pp. 47-58.

Rappole, J. H., Hubálek, Z. (2006). Birds and influenza H5N1 virus movement to and within North America. Emerging Infectious Diseases 12, pp. 1486-1492.

6. Bibliografía

Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., Sanjay, K. S. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: West Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical Medicine & Research* 1, pp. 5-12.

Rosenberger, J.K., Sterner, F.J., Botts, S., Lee, K.P., Margolin, A. (1989). In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolated. *Avian Diseases* 33, pp. 535-544.

Rossi, G., Taccini, E., Tarantino, C. (2005). Outbreak of avian polyomavirus infection with high mortality in recently captured crimson seedcrackers. *Journal of Wildlife Diseases* 42, pp. 236-240.

Routh, A., Sleeman, M. (1995). Greenfinch mortalities. *The Veterinary Record* 136, pp. 500.

Rueda, M.J., Baragaño, J.R., Notario, A., Castesana, L. (1993). Estudio de la alimentación natural de los pollos de perdiz roja (*Alectoris rufa*). *Ecología* 7, pp. 429-454.

Saenz de Buruaga, M., Lucio, A.J., Purroy, F.J. Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegeticas, pp. 79-81.

Seimon, T.A., McAloose, D., Raphael, B., Honkavuori, K.S., Chang, T., Hirschberg, D.L., Lipkin, W.I. (2012). A novel herpesvirus in 3 species of pheasants: Mountain peacock pheasant (*Polyplectron inopinatum*), malayan peacock pheasant (*Polyplectron malacense*) and congo peafowl (*Afropavo congensis*). *Veterinary Pathology* 49(3), pp. 482-491.

Shane, S.M., Harrington, K.S., Montrose, M.S. & Roebuck, R.G. (1984). The occurrence of *Aeromonas hydrophila* in avian diagnostic submissions. *Avian Diseases* 28, pp. 804-807.

Snow, D., Perrins, C.M., (1998). The birds of the Western Palearctic. Concise Edition. Volume 1 & 2 (Passerines). Oxford University Press. Oxford.

6. Bibliografía

Sotelo, E., Gutierrez-Guzmán, A.V., del Amo, J., Ilorente, F., El-Harrak, M., Pérez-Ramírez, E., Blanco, J.M., Höfle, U., Jiménez-Clavero, M.A. (2011). Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Veterinary Research* 42(11).

Stallknecht, D.E. (1998). Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia. US Animal Health Association, pp. 61-69.

Steinmetz, H.W., Bakonyi, T., Weissenböck, H., Hatt, J.M., Eulenbergh, U., Robert, N., Hoop, R., Nowotny, N. (2011). Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Veterinary Microbiology* 148(2-4), pp. 207-212.

Stoll, R., Luo, D., Kouwenhoven, B. (1993). Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses from a distinct subgenus within the polyomavirus genus. *Journal of General Virology* 74, pp. 229-237.

Sun L., Zhang, G.H., Jiang, J.W., Fu, J.D., Ren, T., Cao, W.S., et al. (2007). A Massachusetts prototype-like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Research* 130, pp. 121-128.

Swayne, D. (2013). *Diseases of poultry*. 13th edition. Eds. Wiley-Blackwell.

Thureen, D.R., Keeler, C.L. (2006). Psittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: comparative genome sequence analysis of two avian alphaherpesviruses. *Journal of Virology* 80, pp. 7863-7872.

Tompkins, D.M., Greenman, J.V., Hudson, P.J. (2001). Differential impact of shared nematode parasite on two gamebird host: implications for apparent competition. *Parasitology* 122, pp. 187-193.

6. Bibliografía

Van der Heide, L., Kalbac, M. (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterisation of a Connecticut virus isolate as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Diseases* 19, pp. 683-688.

Vandamme, P., De Ley, J., (1991). Proposal for a new family Campylobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, pp. 451-455.

VanDevanter, D., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34(7), pp. 1666-1671.

Vázquez, B., Esperón, F., Neves, E., López, J., Ballesteros, C., Muñoz, M.J. (2010). Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(45).

Villanúa, D. (2008). Parásitos de la Perdiz Roja (*Alectoris rufa*): Implicaciones para su Aprovechamiento Cinegético y Conservación. Veterinary Medicine thesis, Universidad de Castilla La Mancha, Ciudad Real, Spain.

Villanúa, D., Pérez-Rodriguez, L., Casas, F., Alzaga, V., Acevedo, P., Viñuela, J., Gortázar, C. (2008). Sanitary risk of red-legged partridge releases: introduction of parasites. *European Journal of Wildlife Research* 54, pp. 199-204.

Volkheimer A, Wuthe HH (1986) *Campylobacter jejuni/coli* in partridges (*Perdix perdix* L.) and pheasants (*Phasianus colchicus* L.). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 99, pp. 374.

Waldenström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R. P., Wagenaar, J.A., Olsen, B. (2002). Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology* 68, pp. 5911-5917.

Wetzel E, (1951). Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. Improved McMaster chamber for counting worm eggs. *Tierärztl Umsch*, 6, pp. 209-210.

6. Bibliografía

Witter, R.L., (1997). Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* 41, pp. 149-163.

Witter, R.L., Calnek, B.W., Buscaglia, C., Gimeno, I.M., Schat, K.A., (2005). Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 34, pp. 75-90.

Wünschmann, A., Ziegler, A. (2006). West Nile virus-associated mortality events in domestic Chukar partridges (*Alectoris chukar*) and domestic Impeyan pheasants (*Lophophorus impeyanus*). *Avian Diseases* 50(3), pp. 456-459.

Yoon, S.W., Webby, R.J., Webster, R.G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 385, pp. 359-375.

Zhang, Y., Li, Z., Bao, K., Lv, H., Gao, Y., Gao, H., Qi, X., Cui, H., Wang, Y., Ren, X., Wang, X., Liu, C. (2015). Pathogenic characteristics of Marek's disease virus field strains prevalent in China and the effectiveness of existing vaccines against them. *Veterinary Microbiology* 177, pp. 62-68.